

**„Rola kanałów błonowych retikulum endoplazmatycznego (ER) w transporcie rycyny z ER do cytozolu”
mgr Natalia Sowa-Rogozińska**

Retikulum endoplazmatyczne (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) tworzy nieregularną sieć cystern i kanalików odizolowanych od cytoplazmy błonami biologicznymi. Charakterystyczna struktura, którą cechuje obecność licznych rybosomów to szorstka siateczka śródplazmatyczna (ang. *rough endoplasmic reticulum*, RER), która odpowiada m.in. za biosyntezę białek wydzielanych na zewnątrz komórki oraz określonych białek wewnątrzkomórkowych. Białka, które nie osiągnęły swojej struktury natywnej w ER, są transportowane do cytozolu, gdzie ulegają degradacji zależnej od proteasomu. Ten wyspecjalizowany proces rozpoznawania substratów w ER, ich transportu do cytozolu, a następnie degradacji jest określany jako proces degradacji zależnej od ER (ang. *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*, ERAD). Białka są transportowane z ER do cytoplazmy przez specjalne kanały translokacyjne obecne w błonie ER. Znamy obecnie kilka typów kanałów. Są one tworzone m.in. przez białka błonowe: Sec61, Derlin oraz ligazy ubikwityny związane z ER w tym HRD1. Kompleks Sec61 to heterotrimer, który składa się z podjednostek: α (występującej w dwóch izoformach - Sec61A1 oraz Sec61A2), β oraz γ . Proces selekcji tych kanałów przez substraty procesu ERAD jest bardzo słabo poznany. Przez kanały błonowe ER transportowane są nie tylko źle sfałdowane białka. Niektóre wirusy i toksyny aktywnie działające w cytoplazmie wykorzystują ERAD w swoim transporcie z ER do cytozolu. Jednym z nietypowych substratów procesu ERAD jest toksyna pochodzenia roślinnego - rycyna.

Głównym celem niniejszej pracy badawczej była charakterystyka izoform białka Sec61 α w różnych liniach komórkowych oraz poznanie mechanizmów selekcji kanałów błonowych retikulum endoplazmatycznego tj. kompleksu Sec61 oraz białek z rodziny Derlin przez rycynę.

W pracy wykazano, że we wszystkich badanych liniach komórkowych tj. HEK293, HeLa, HDFa oraz Vero geny kodujące izoformę 1 i 2 białka Sec61 α ulegają ekspresji. W liniach HEK293, HeLa oraz HDFa ekspresja genu *SEC61A1* kodującego izoformę 1 białka Sec61 α jest znacznie wyższa niż ekspresja genu izoformy 2 tego białka. W linii komórkowej Vero dominującą okazała się izoforma 2 białka Sec61 α kodowana przez gen *SEC61A2*.

W celu obniżenia ekspresji genów poszczególnych izoform białka Sec61 α , zastosowano transfekcję komórek specyficznym siRNA typu esi. Dowiedziono, że obniżenie poziomu białka Sec61 α nie wpływa znacząco na żywotność komórek HEK293 i Vero. Badania transportu enzymatycznie aktywnego łańcucha A rycyny (ang. *ricin toxin A chain*, RTA) z ER do cytozolu wykazały, że obniżenie ilości izoformy 1 oraz obu izoform białka Sec61 α

nie wpływa na transport RTA z ER do cytozolu w komórkach HEK293. W tych komórkach, w warunkach wydajnego wyciszenia ekspresji genu kodującego izoformę 1 białka Sec61 α dochodzi do obniżenia ilości transkryptu genu kodującego izoformę 2 i do podwyższenia ekspresji genów kodujących białka z rodziny Derlin tj. Derlin-1, Derlin-2, Derlin-3. Sugeruje to potencjalne zaangażowanie białek Derlin w transport RTA, szczególnie w komórkach z nieaktywnym translokonom Sec61. Te sugestie stanowiły podstawę do dalszych badań, które wykazały, że nadprodukcja białek Derlin-1 oraz Derlin-2 nie wpływa na zmianę cytotoksyczności rycyny oraz na retrotranslokację RTA z ER do cytozolu. Z kolei nadprodukcja białka Derlin-3 wpływa na obniżenie transportu RTA z ER do cytozolu.

Przedstawione w pracy analizy wykazały, że w przeciwieństwie do innych badanych linii komórkowych, w komórkach Vero gen izoformy 2 białka Sec61 α jest ekspresyjny na wyższym poziomie niż gen izoformy 1, a izoformę 2 można uznać za dominującą. Wyniki eksperymentów badania transportu RTA z ER do cytozolu w komórkach Vero wykazały, że obniżenie ilości izoformy 2 oraz obu izoform białka Sec61 α wpływa na obniżenie retrotranslokacji RTA z ER do cytozolu. Wyniki te wskazują, że transport podjednostki A rycyny z ER do cytozolu jest zależny w sposób specyficzny od izoformy 2 białka Sec61 α .

Podsumowując, badania w komórkach HEK293 i Vero ujawniły złożoność mechanizmu transportu RTA z ER do cytozolu. W komórkach HEK293, kompleks Sec61 oraz białka Derlin-1 i Derlin-2 nie odgrywają istotnej roli w tym procesie, natomiast nadprodukcja Derlin-3 może wpływać na obniżenie transportu RTA do cytozolu. W komórkach Vero transport RTA okazał się specyficznie zależny od izoformy 2 białka Sec61 α , podkreślając jej kluczową rolę w retrotranslokacji RTA.

Przeprowadzone badania dostarczają cennych informacji na temat roli kanałów translokacyjnych ER, takich jak Sec61 i Derlin, w kontekście procesu ERAD. W niniejszej pracy wykorzystano rycynę, nietypowy substrat tego procesu, aby dokładnie zbadać jej kierowanie do retikularnych kanałów błonowych i lepiej poznać ich funkcjonowanie.

Rycyna może być wykorzystana w leczeniu nowotworów dzięki swojej aktywności cytotoksycznej, ale może również służyć jako broń biologiczna wymagająca opracowania odpowiedniego leku. Zrozumienie mechanizmów jej działania, w tym sposobów transportu z ER do cytozolu, które bezpośrednio wpływają na toksyczność rycyny pozwala lepiej zrozumieć procesy związane z aktywnością tej toksyny.